

## Генотипическая изменчивость *Pinus sylvestris* L. по признаку засухоустойчивости

Е.Ю. Аминова<sup>1</sup>✉, А.П. Гуреев<sup>2</sup>, Т.М. Табацкая<sup>1</sup>, О.С. Машкина<sup>1, 2</sup>, В.Н. Попов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж, Россия

<sup>2</sup> Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

✉ e-mail: elena.pardaeva@mail.ru

В связи с глобальным изменением климата в последние десятилетия отмечается учащение и усиление засух. Не все растительные организмы способны адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды. Поэтому вопрос отбора стрессоустойчивых (засухоустойчивых) генотипов, перспективных для проведения селекционных работ, стоит достаточно остро. Проблема касается и лесных древесных растений, в том числе сосны обыкновенной, являющейся одним из основных лесообразователей на территории Воронежской области. В настоящем исследовании приведены результаты анализа вегетативной и генеративной сферы отдельных деревьев сосны обыкновенной с помощью биотехнологического, молекулярно-генетического и цитогенетического методов. Возможность применения метода культуры ткани *in vitro* с целью тестирования исходных растений на стрессоустойчивость, в том числе и засухоустойчивость, объясняется взаимосвязью свойств клеток, тканей и целого растения. Показано, что у различающихся генотипов цитогенетические характеристики семенного потомства и показатели каллусогенных реакций не всегда совпадают: у одних энергетические ресурсы тратятся на защиту онтогенеза, у других – на поддержание репродуктивной функции. Выделены деревья, состояние генеративной сферы которых в засушливые годы находится на уровне оптимальных лет и реакция их каллусных культур остается неизменной даже в моделируемых условиях засухи. На основе полученных результатов для отбора засухоустойчивых генотипов сосны обыкновенной предлагаем использовать систему критериев, характеризующих как способность вегетативной сферы к выживанию в условиях засухи на основе метода культуры ткани *in vitro* (скорость формирования каллусной ткани, ее жизнеспособность, частота каллусогенезов), так и состояние генеративной сферы с помощью цитогенетического анализа семенного потомства (частота патологий митоза, доля клеток с микроядрами, митотическая активность). Целесообразность применения биотехнологического подхода была доказана с помощью анализа уровня экспрессии генов стрессовых белков: между уровнем экспрессии гена *AbaN* и показателем жизнеспособности каллусных культур установлена сильная корреляционная связь, в том числе и на питательной среде с дополнительным стрессовым агентом (NaCl). Деревья, которые по результатам анализа можно отнести к засухоустойчивым, следует рекомендовать для использования в работах по селекции.  
Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L.; засуха; засухоустойчивость; каллусы; экспрессия генов; жизнеспособность каллусных культур; митоз.

**Для цитирования:** Аминова Е.Ю., Гуреев А.П., Табацкая Т.М., Машкина О.С., Попов В.Н. Генотипическая изменчивость *Pinus sylvestris* L. по признаку засухоустойчивости. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019; 23(1):15-23. DOI 10.18699/VJ19.456

## Genotypic variability of *Pinus sylvestris* L. on the drought-resistance attribute

E.Yu. Amineva<sup>1</sup>✉, A.P. Gureev<sup>2</sup>, T.M. Tabatskaya<sup>1</sup>, O.S. Mashkina<sup>1, 2</sup>, V.N. Popov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Voronezh, Russia

<sup>2</sup> Voronezh State University, Voronezh, Russia

✉ e-mail: elena.pardaeva@mail.ru

There was an increase and intensification of droughts in connection with global climate change in recent decades. Not all plant organisms are able to adapt to changing environmental conditions. Therefore, the question of stress-resistant (drought-resistant) genotypes selection for breeding is quite urgent. This problem also concerns forest tree plants, including Scots pine, which is one of the main foresters in the Voronezh region. The results of vegetative and generative sphere analysis of individual Scotch pine trees with the help of biotechnology, molecular-genetic and cytogenetic method are given in this study. The possibility of applying the tissue culture method *in vitro* for testing initial plants for stress resistance, including drought resistance, is explained by the interconnection of cells, tissues and the whole plant properties. It is shown that the cytogenetic characteristics of the seed progeny and the indicators of callusogenic reactions do not always coincide in different genotypes: in some cases energy resources are spent on ontogeny protection, while, in other cases, to reproductive function maintain. There are trees, in which the state the generative sphere in arid years is at the level of optimal years, and their callus cultures reaction remains unchanged even under simulated conditions of drought. Based on the results obtained for the selection of Scots pine drought-resistant genotypes we suggest applying a system of criteria characterizing both the ability of the

vegetative sphere to survive in drought conditions on the basis of the tissue culture method *in vitro* (callus tissue formation speed, its viability, frequency of callusogenesis), and the state of the generative sphere with the help of cytogenetic analysis of seed progeny (frequency of mitosis pathologies, the proportion of cells with micronuclei, mitotic activity). The expediency of applying the biotechnological approach was proved by analysis of the gene expression level of stress proteins: the level of *AbaH* gene expression correlates greatly with the indicator of the viability of callus cultures, including ones on a nutrient medium with an additional stress agent (NaCl). Trees that can be assigned to drought-resistant ones, according to the results of the analysis, should be recommended for use in breeding.

**Key words:** *Pinus sylvestris* L.; drought; drought-resistance; callus; gene expression; viability of callus cultures; mitosis.

**For citation:** Amineva E.Yu., Gureev A.P., Tabatskaya T.M., Mashkina O.S., Popov V.N. Genotypic variability of *Pinus sylvestris* L. on the drought-resistance attribute. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):15-23. DOI 10.18699/VJ19.456 (in Russian)

## Введение

Засухой называют неблагоприятное сочетание метеорологических условий, характеризующихся длительным и значительным недостатком осадков, повышенной температурой и пониженной влажностью воздуха (Пахомова, 1999). На долю засух среди всех аномальных природно-климатических явлений приходится около 26 % случаев (Tugce, Yasemin, 2005). Засухоустойчивыми считают растения, способные переносить длительные засушливые периоды, водный дефицит, обезвоживание клеток, тканей, органов с наименьшим снижением вегетативной и генеративной продуктивности. В первую очередь, засухоустойчивость обусловлена генетическими особенностями организма и зависит от местообитания растения (Генкель, 1982).

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) относится к породам высокой хозяйственной ценности, обладает генетической гетерогенностью и экологической пластичностью, может произрастать в разнообразных природно-климатических условиях, на почвах, возникших из различных геологических пород, которые отличаются по химическому составу, увлажнению и плодородию (Правдин, 1964; Миркин и др., 2000; Кузнецова, 2010, 2012). На территории Воронежской области сосна – одна из основных лесообразующих пород (Чернодубов, Смогунова, 1998).

Несмотря на то, что *P. sylvestris* L. относят к засухоустойчивым породам, степень ее толерантности к этому стрессовому фактору ограничена. Она определяется нормой реакции вида, которая в каждом регионе имеет свои внутривидовые границы (Тимофеев-Ресовский и др., 1973). Свидетельством тому служит массовое усыхание сосен на территории Воронежской области весной 2011 г., наступившее после сильнейшей летней засухи 2010 г. (Кузнецова, 2012). Нужно отметить, что часть деревьев выжила. В связи с этим возникает вопрос об отборе засухоустойчивых генотипов сосны обыкновенной, перспективных в качестве источников семян для лесного хозяйства. Учитывая тот факт, что засухоустойчивыми считают не только выжившие в условиях засухи, но и способные к половой репродукции при дефиците влаги растительные организмы (Генкель, 1982; Tardieu, 2005), в своих исследованиях мы использовали биотехнологический, цитогенетический и молекулярно-генетический методы для оценки состояния вегетативной и генеративной сферы сосны обыкновенной.

Цель работы – выявить генотипическую изменчивость сосны обыкновенной по признаку засухоустойчивости на территории Воронежской области с использованием

различных подходов, рекомендовать критерии для отбора засухоустойчивых форм сосны.

## Материалы и методы

Исследования проводились на шести отдельных деревьях сосны обыкновенной (д. 1, 3, 6, 8, 9, 12) из сорта-популяции сосна Острогжская (Кузнецова, Машкина, 2017) возрастом 33–35 лет, II класса бонитета (Кузнецова, 2010, 2012).

Для получения первичных каллусных культур *in vitro* сосны обыкновенной в апреле-мае собирали ветви с молодыми зелеными побегами, сегменты которых служили эксплантами. Использовали питательную среду Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с половинным содержанием макроэлементов (1/2 MS), 3 % сахарозой, регуляторами роста: 6-бензиламинопурина (6-БАП – 0.5 мг/л), нафтилуксусная кислота (НУК – 2 мг/л), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д – 1 мг/л). Получение и выращивание каллусных культур осуществляли в условиях культуральной комнаты: 2000 люкс, 16-часовой фотопериод, температура 25–26 °С. Каждый отдельный опыт проводили в трехкратной повторности (не менее 10–20 асептических культур для каждого дерева). Первичную каллусную ткань изолировали и переносили на свежие питательные среды через 20–25 сут от начала культивирования. Каллусы анализировали по признакам: частота каллусогенеза (ЧК, %); отношение количества эксплантов со сформировавшимся каллусом относительно общего количества эксплантов; скорость формирования каллусной ткани (СК, сут) – время образования первых следов каллуса на экспланте; жизнеспособность (ЖК, сут) – скорость распространения мертвой каллусной ткани, окрашенной в темно-коричневый цвет.

Для усиления стрессовой нагрузки в питательную среду добавляли NaCl (1 %) (Аmineva и др., 2017), позволяющий моделировать не только солевой, но и осмотический стресс, схожий по механизму действия с засухой (Игнатова, 2011).

Тотальную РНК выделяли из 50 мг ткани первичного каллуса с использованием коммерческого набора ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep (Zymo Research, США), согласно прилагаемому протоколу. Реакцию обратной транскрипции проводили с применением обратной транскриптазы M-MuLV (Evrogen, Россия) (40 ед.). Анализировали экспрессию четырех генов первичных каллусных культур: *AbaH*, *LEA*, *ADC*, *GapC1*. Использовали следующие праймеры: *AbaH* (abscisic acid and water-stress induced

protein): F-5'-AGGACAACGTTAATTCTGGCTC-3', R-5'-AATCGGCCTTATAACCAGTGTGCG-3' (Voronova et al., 2011); *LEA* (late embryogenesis abundant protein): F-5'-TCCGCAGAGGTTACAGACATCG-3', R-5'-СТАТТТГСГСТСАГГТСАГГАА-3' (Voronova et al., 2011); *ADC* (arginine decarboxylase): F-5'-AGAAATTG GGGATGCTGGAT-3', R-5'-GCCATCACGATTGTATT CACC-3' (Vuosku et al., 2006). В качестве референсного гена рассматривали *GapC1* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase): F-5'-ACGGTTTTGGTCAATTG-3', R-5'-CCCACGAGCTCGATATCAT-3' (Voronova et al., 2011). К настоящему времени геном сосны обыкновенной полностью не изучен. Для исследования были взяты именно эти гены, так как известно, что в условиях стресса, в том числе и при засухе, отмечается изменение их активности (Vuosku et al., 2006; Voronova et al., 2011).

В ходе цитогенетических исследований анализировали семенное потомство сосны обыкновенной от свободного опыления. Семена заготавливали в годы, контрастные по погодным условиям: 2011, 2015 – благоприятные; 2010, 2012, 2014 – различающиеся по типам засух и степени их воздействия на генеративную сферу сосны обыкновенной. В 2010 г. на территории всего Центрально-Черноземного района (ЦЧР) наблюдались весенняя и летняя засухи (Шакина, 2011), сдвинувшие репродуктивные процессы сосны на более ранние сроки (Кузнецова, 2012). Засуха 2012 г. (весенняя) привела к опадению шишек второго года развития на всей территории Воронежской области. В 2014 г. наблюдалась поздняя осенняя засуха, в основном оказавшая воздействие на вегетативную сферу сосны (пожелтение и опад хвои), также способствовавшая раннему раскрытию шишек (Кузнецова, 2015).

Проростки длиной 0.5–1 см фиксировали в спиртовом-уксусной смеси (3:1) в утренние часы. Давленные микропрепараты изготавливали по методике Л.А. Топильской с коллегами (1975), в нашей модификации. Их анализ проводили на микроскопе Микмед-5 при увеличении  $40 \times 1.5 \times 10$ . Микрофотосъемку осуществляли с помощью цифровой камеры окуляра DCM500. Цитогенетический анализ семенного потомства проводился для каждого дерева отдельно. Просматривали не менее 10 корешков проростков с генотипа. Анализировали не менее 100 делящихся клеток корневой меристемы с каждого препарата по следующим параметрам: частота и спектр патологий митоза (ПМ, %), частота встречаемости клеток с микроядрами (%), митотическая активность (МА, %). Митотическую активность определяли в 9–10 ч утра (Буторина и др., 2002). Для средней полосы России в норме значение показателя МА колеблется от 6.0 до 8.7 % (Буторина и др., 2001).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica и Stadia. Для сравнения выборок по каллусогенной эффективности, экспрессии генов, а также по МА использовали *t*-критерий Стьюдента. Сравнение выборок по патологиям митоза осуществляли с помощью критерия Ван-дер-Вардена. Разницу между сравниваемыми показателями считали достоверной при  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$ . Связь показателей каллусогенных реакций и уровня экспрессии генов определяли на основе коэффициента корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Кор-

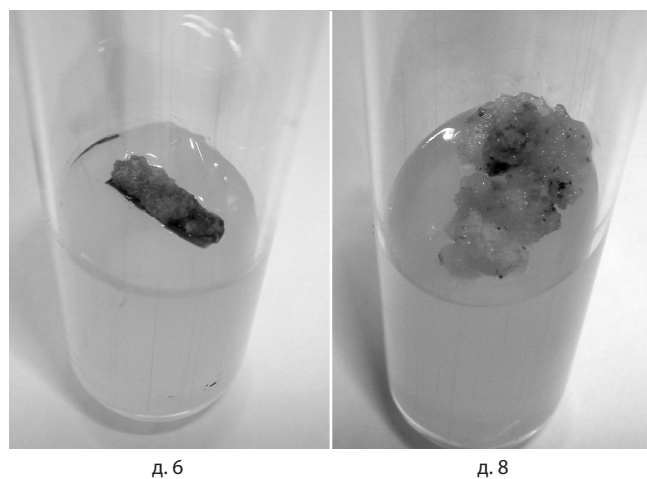
реляцию считали отличной от нуля при  $p < 0.05$ . Силу корреляционной связи выявляли по следующим интервалам значений коэффициента корреляции: от 0.6 до 1.0 – высокая, от 0.3 до 0.59 – средняя, от 0 до 0.29 – низкая.

## Результаты

В ходе анализа реакции каллусных культур на условия культивирования для эксплантов д. 5, 7, 8, 11, 14 формирование каллусной ткани отмечалось на 4–7-е сут, в то время как у д. 2, 6, 9, 10, 12 сроки смещены на 10–14-е сут (табл. 1). Разница по признаку СК проиллюстрирована на рис. 1: к 15-м сут культивирования на экспланте

**Таблица 1.** Оценка эффективности каллусогенеза стеблевой ткани сосны обыкновенной в зависимости от генотипа исходных деревьев

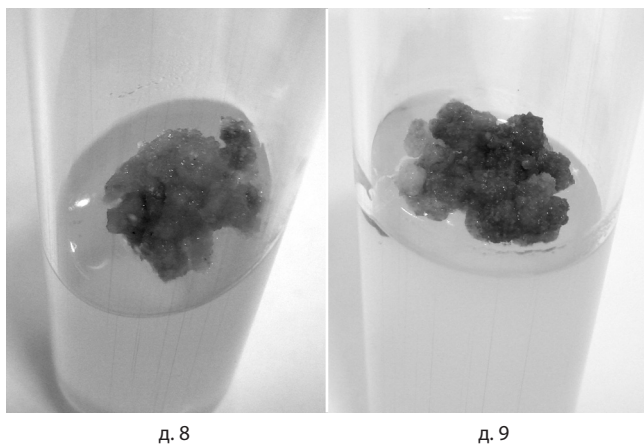
Номер дерева	Скорость формирования каллусной ткани, сут	Частота каллусогенеза, %	Жизнеспособность каллусной ткани, сут
1	9.7±0.8	40.0±4.5	12.0±0.6
2	10.3±0.6	58.3±2.9	12.3±0.7
3	8.7±0.3	66.5±2.9	15.7±0.3
4	9.3±0.5	78.3±2.3	11.7±1.5
5	6.7±0.6	80.0±5.0	17.0±0.9
6	13.3±0.6	33.3±2.8	11.0±1.0
7	7.0±0.8	50.0±4.2	10.9±0.9
8	4.7±0.4	91.8±3.1	23.3±1.5
9	11.7±0.3	68.9±6.9	11.5±0.3
10	10.3±1.2	33.3±5.6	10.7±0.4
11	5.2±0.9	81.2±6.8	19.8±0.6
12	8.6±0.6	86.3±4.5	16.7±0.3
13	13.6±1.3	41.6±3.2	9.4±0.7
14	5.1±0.4	64.2±3.4	8.8±0.5



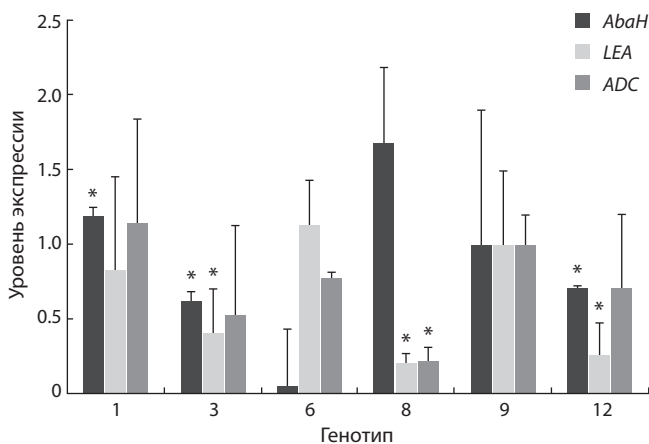
**Рис. 1.** Разница в скорости формирования каллусной ткани на эксплантах различных генотипов сосны обыкновенной *in vitro* (15-е сут культивирования).

**Таблица 2.** Жизнеспособность каллусных культур (сут) различных генотипов сосны обыкновенной в условиях дополнительной стрессовой нагрузки (1 % NaCl)

Генотип	Контроль	1 % NaCl
1	11.7 ± 1.2	0
3	16.4 ± 2.3	15.9 ± 1.8
6	9.7 ± 1.1	0
8	22.5 ± 3.1	22.3 ± 2.2
9	10.7 ± 1.3	0
12	15.5 ± 2.1	14.9 ± 1.6



**Рис. 2.** Реакция каллусных культур различных генотипов сосны обыкновенной в ответ на «засоление» питательной среды 1 % NaCl (10-е сут культивирования).



**Рис. 3.** Уровень экспрессии генов (*AbaH*, *LEA*, *ADC*) в пробах первичной каллусной ткани исследуемых генотипов сосны обыкновенной. Разница с д. 6 достоверна при \* $p < 0.05$ .

д. 6 отмечаются лишь следы каллусной ткани, в то время как на экспланте д. 8 каллусные клетки активно пролиферируют.

Достоверная разница ( $p < 0.05$ ) наблюдалась и по признаку ЧК (см. табл. 1). Так, д. 5, 8, 11, 12 имели самые

высокие значения ЧК, более 80 %:  $80.0 \pm 5.0$ ;  $91.8 \pm 3.1$ ;  $81.2 \pm 6.8$ ;  $86.3 \pm 4.5$  % соответственно. Для д. 1, 6, 10, 13 уровень ЧК не превышал значения 50 %:  $40.0 \pm 4.5$ ;  $33.3 \pm 2.8$ ;  $33.3 \pm 5.6$ ;  $41.6 \pm 3.2$  % соответственно.

Для д. 1, 3, 6, 8, 9, 12 проводили эксперименты в моделируемых условиях стресса, определяли уровень экспрессии генов стрессовых белков, а также анализировали состояние генеративной сферы в динамике лет (см. табл. 1).

На следующем этапе осуществлялись работы в моделируемых условиях засухи, которые обеспечивались за счет введения в питательную среду дополнительного стрессового агента – NaCl (1 %). Каллусные культуры трех деревьев (д. 3, 8, 12) не реагировали на добавление соли, их жизнеспособность оставалась на том же уровне, что и в контрольном варианте. Для каллусов д. 1, 6, 9 к 15-м сут культивирования отмечалась 100 % некротизация (табл. 2). На рис. 2 показана разница в реакции каллусных культур д. 8 и д. 9 по признаку жизнеспособности в ответ на засоление питательной среды: к 10-м сут культивирования каллус д. 8 остается жизнеспособным, каллусная ткань д. 9 характеризуется обширными очагами мертвой ткани.

Анализ активности генов показал: уровень экспрессии гена *AbaH* в каллусных культурах деревьев с низкими показателями каллусогенной активности был ниже по сравнению с остальными (рис. 3). Так, для д. 6 это значение составило 0.05, тогда как для д. 9 с высокой каллусогенной активностью – 1.0. Между уровнем экспрессии данного гена и показателем жизнеспособности каллусных культур установлена сильная корреляционная связь, в том числе и на питательной среде с NaCl ( $r_s = 0.75$  и  $0.65$  соответственно).

Экспрессия гена *LEA* повышена у каллусных культур д. 1, 6, 9:  $0.83 \pm 0.07$ ;  $1.13 \pm 0.06$ ;  $1.0 \pm 0.5$  соответственно. Снижение экспрессии гена *ADC* отмечается для культур д. 3 и 8:  $0.53 \pm 0.6$  и  $0.22 \pm 0.1$  соответственно.

Однако данные по уровню экспрессии этих двух генов не совпадают с общей тенденцией показателей каллусогенных реакций. Между уровнем экспрессии исследуемых генов выявили положительную сильную корреляцию между *LEA* и *ADC* ( $r_s = 0.7$ ). Между генами *AbaH* и *LEA*, а также *AbaH* и *ADC* слабая отрицательная корреляция ( $r_s = -0.1$  в обоих случаях).

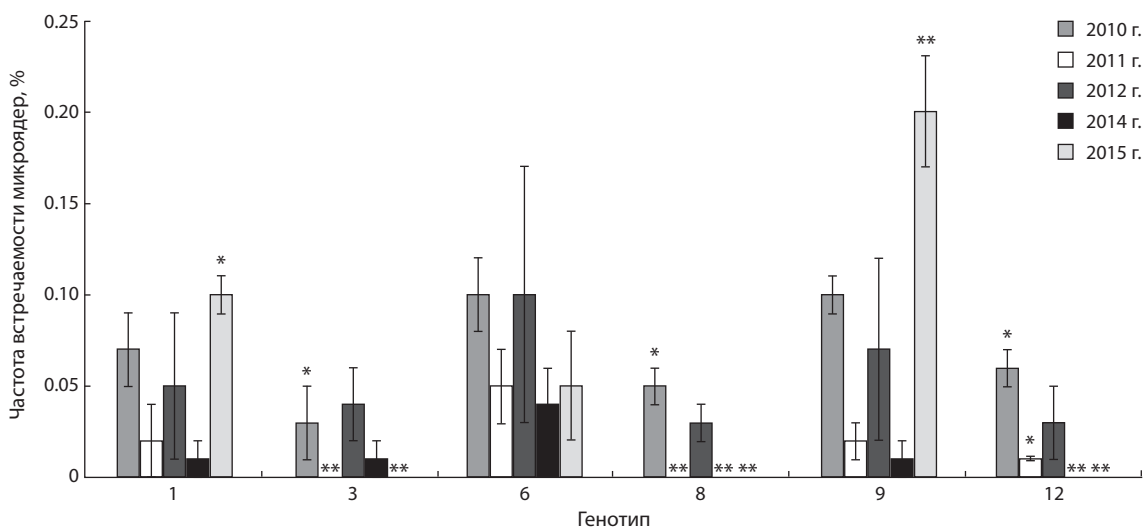
В ходе цитогенетического анализа семенного потомства сосны обыкновенной по частоте патологий митоза ни в один год исследования значительных превышений нормы не отмечено, только в 2012 г. для потомства д. 6 –  $5.1 \pm 2.3$  % (табл. 3).

Микроядра (рис. 4) в клетках могут приводить к цитогенетической нестабильности клеточных популяций (Ильинских и др., 1988; Буторина и др., 2005). Так, для д. 6, частота ПМ которого в 2012 г. составила  $5.1 \pm 2.3$  %, доля клеток с микроядрами в эти годы была  $0.1 \pm 0.07$  %. Однако для потомства деревьев, чьи показатели частоты ПМ были менее 3 % или превышали эту цифру незначительно, отмечался низкий уровень содержания микроядер: д. 3, 8, 12.

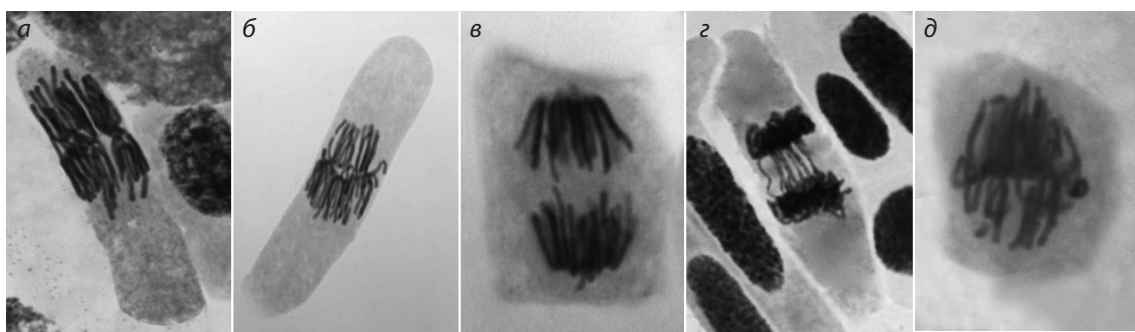
За все годы исследований было обнаружено 9 типов ПМ: 1 – отставание хромосом в метакинезе; 2 – обособление хромосом и групп хромосом в метафазе (рис. 5, а); 3 – фрагменты хромосом в метафазе и анафазе (см. рис. 5, б);

**Таблица 3.** Частота патологических митозов (%) в семенном потомстве деревьев сорта-популяции сосна Острогжская в годы, различающиеся по погодным условиям

Номер дерева	2010 г., весенняя и летняя засухи	2011 г., благоприятный	2012 г., весенняя засуха	2014 г., осенняя засуха	2015 г., благоприятный
1	3.8 ± 0.3	1.5 ± 0.4	3.8 ± 0.3	2.5 ± 0.6	1.6 ± 0.6
3	2.6 ± 0.3	1.5 ± 0.3	2.3 ± 1.6	2.4 ± 0.4	1.2 ± 0.4
6	3.5 ± 0.4	2.5 ± 0.5	5.1 ± 2.3	3.3 ± 0.9	3.1 ± 1.1
8	2.7 ± 0.1	0.5 ± 0.3	2.5 ± 1.8	1.7 ± 0.6	1.4 ± 0.5
9	3.7 ± 0.2	1.9 ± 0.6	3.0 ± 1.3	2.1 ± 0.6	2.4 ± 0.8
12	2.2 ± 0.2	1.4 ± 0.9	3.2 ± 1.4	3.1 ± 0.8	1.5 ± 0.5



**Рис. 4.** Доля клеток с микроядрами в потомстве сосны обыкновенной в контрастные по погодным условиям годы. Разница с д. б достоверна при \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

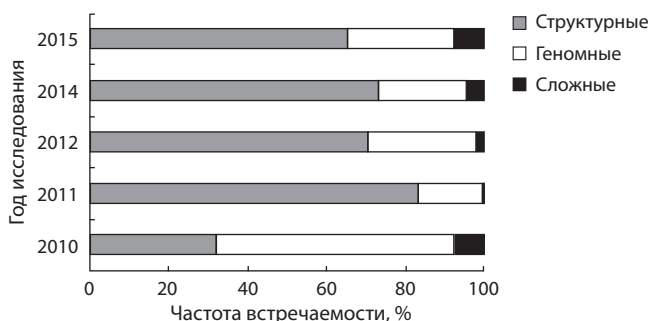


**Рис. 5.** Типы патологий митоза, встречающиеся в клетках корневой меристемы сосны обыкновенной: а – обособление группы хромосом в метафазе; б – фрагменты хромосом в метафазе; в, з – мосты в анафазе (в – разорванный мост) и телофазе (з – множественные мосты); д – сложные нарушения (фрагмент хромосомы + кольцевая хромосома).

4 – отставание в анафазе; 5 – забегание в анафазе и мета-анафазе; 6 – неравноценное расхождение хромосом в анафазе; 7 – мосты в анафазе и телофазе (см. рис. 5, в и 5, з); 8 – сложные нарушения (см. рис. 5, д); 9 – кольца в мета-, ана-, мета-анафазе.

Все типы нарушений митоза были условно разделены на группы: хромосомные (тип 3, 7, 9), геномные (тип 1, 2,

4, 5, 6), сложные (тип 8). Из диаграммы на рис. 6 следует, что после осенней засухи 2014 г. уровень хромосомных патологий постепенно снижается. Если в потомстве 2010 г. уровень структурных нарушений был самый низкий – 32.2 %, то в 2011 г. (оптимальный по погодным условиям) значение данного показателя возрастает до 83.4 %. В последующие годы также наблюдается преобладание



**Рис. 6.** Спектр патологий митоза в семенном потомстве сосны обыкновенной в годы, различающиеся по погодным условиям.

хромосомных aberrаций: 2012 г. – 70.5 %, 2014 г. – 72.3 %. И лишь с 2015 г. отмечается снижение уровня данного показателя – 65.6 %.

В год аномальной летней засухи (2010) наблюдалось многократное превышение по показателю МА, причем для потомства некоторых деревьев более чем в два раза: д. 1, 6, 9 (табл. 4). В 2012 г., оказавшем сильнейшее воздействие на генеративную сферу сосны обыкновенной по всему ЦЧР, наблюдалось незначительное угнетение митотической активности для д. 6 ( $5.8 \pm 1.5$  %) и также превышение для д. 9 ( $9.0 \pm 1.5$  %). В целом в этот и последующие годы показатель МА был в норме (см. табл. 4).

## Обсуждение

Эффективность каллусогенеза, в первую очередь, зависит от генотипических особенностей исходных растений (Murashige, 1962; Лутова, 2010; Кунах, 2011). В связи с этим уже на протяжении многих лет ведутся исследования, свидетельствующие о целесообразности применения метода культуры ткани *in vitro* для изучения устойчивости растений к различным стрессовым факторам, в том числе и к засухе (Терлецкая и др., 2008; Россеев и др., 2010, 2016; Егорова, 2011).

Показано, что различия можно наблюдать уже на начальных этапах формирования каллусной ткани (Шестибратов и др., 2008; Соболева, 2013). Данный факт подтвержден и нами: сроки появления первых следов каллуса в зависимости от исходного генотипа разнятся от 4.7 (д. 8) до 13.6 (д. 13) сут. Установлено, что больший уровень ЧК характерен для каллусных культур, период формирования

каллусной ткани которых сдвинут на более ранние сроки, и наоборот – деревья, у которых процесс каллусогенеза шел позже, характеризовались низким уровнем ЧК. Между ЖК и другими показателями существует взаимосвязь: экспланты, на которых формирование каллуса происходит раньше, характеризуются и более высокими значениями по параметрам ЧК, ЖК и наоборот – экспланты, позже других формирующие каллусную ткань, имеют низкий уровень ЧК и ЖК, что было доказано с помощью корреляционного анализа полученных значений. Выявлена отрицательная корреляция средней силы между показателями СК и ЖК ( $r_s = -0.57$ ), сильная отрицательная связь – между СК и ЧК ( $r_s = -0.64$ ). Сильная положительная корреляция отмечалась между ЧК – ЖК ( $r_s = 0.79$ ).

Одним из индикаторов стрессового состояния растений является повышение уровня абсцизовой кислоты (АБК), которая, в свою очередь, изменяет экспрессию генетических программ в клетках (Яковец, 2009). Известно, что экспрессия гена *AbaH* в тканях сосны обыкновенной повышается в результате воздействия на организм обезвоживания либо высоких концентраций АБК (Voronova et al., 2011). Была установлена сильная корреляционная связь между уровнем экспрессии данного гена и показателем жизнеспособности каллусных культур ( $r_s = 0.75$  и  $r_s = 0.65$  в условиях дополнительной стрессовой нагрузки), что свидетельствует о целесообразности применения метода культуры ткани для индикации стрессоустойчивости деревьев сосны обыкновенной.

Белки-дегидрины семейства LEA при нормальном водоснабжении растений обычно синтезируются в зародышах на стадиях позднего эмбриогенеза. В листьях в нормальных условиях эти белки не обнаружены, их накопление индуцирует АБК, синтезирующаяся в ответ на воздействие засухи. Ген *ADC* отвечает за работу аргинин декарбоксилазы, определяющей процесс перехода аргинина в полиамины (Yang et al., 2010). Уровень экспрессии этих двух генов (*LEA* и *ADC*) не совпадает с общей тенденцией по показателям каллусогенных реакций исследуемых деревьев, причем между *AbaH* и *LEA*, а также *AbaH* и *ADC* отмечается слабая корреляция ( $r_s = -0.1$  в обоих случаях).

Частота ПМ достоверно отражает уровень повреждений ДНК и степень воздействия стрессового фактора на состояние генеративной сферы сосны (Пардаева и др., 2013). Рядом исследователей установлено, что в средней полосе

**Таблица 4.** Митотическая активность (%) в семенном потомстве деревьев сосны обыкновенной в контрастные по погодным условиям годы

Номер дерева	2010 г., весенняя и летняя засухи	2011 г., благоприятный	2012 г., весенняя засуха	2014 г., осенняя засуха	2015 г., благоприятный
1	18.9 ± 9.8	8.7 ± 0.7	8.7 ± 1.5	6.7 ± 0.4	7.5 ± 0.4
3	15.5 ± 3.6	8.4 ± 0.6	8.0 ± 1.2	6.4 ± 0.5	7.1 ± 2.1
6	20.2 ± 4.5	9.4 ± 1.0	5.8 ± 1.5	7.0 ± 0.5	5.8 ± 0.3
8	11.5 ± 5.5	8.0 ± 0.4	8.1 ± 2.7	6.5 ± 0.3	8.3 ± 1.4
9	18.7 ± 5.3	8.9 ± 2.1	9.0 ± 1.5	6.6 ± 0.4	8.2 ± 0.6
12	16.7 ± 4.0	8.0 ± 0.4	8.5 ± 2.1	7.2 ± 0.4	6.9 ± 0.4

России для сосны обыкновенной уровень частоты ПМ в норме не должен превышать 5 % (Буторина и др., 2005). Ни в один год исследования превышений нормы не отмечено. Что касается частоты встречаемости клеток с микроядрами, то их повышенное содержание было характерно для потомства деревьев с наибольшим значением частоты ПМ: д. 1, 6, 9. Преобладание хромосомных нарушений в потомстве 2014 г. можно объяснить действием осенней засухи. С 2015 г. отмечается постепенное снижение уровня структурных aberrаций в потомстве исследуемых деревьев ввиду отсутствия засухи.

Митотическая активность обусловлена генетическими особенностями организма. Кроме того, на ее проявление могут оказывать значительное влияние и факторы внешней среды, причем не всегда происходит снижение уровня клеточного деления. В некоторых случаях наблюдается его активация (Митрофанов, 1969). Так, в год аномальной засухи (2010 г.) наблюдалось многократное превышение по данному показателю, причем для потомства некоторых деревьев более чем в два раза – 18.9±9.8 % (д. 1), 20.2±4.5 % (д. 6), 18.7±5.3 % (д. 9). В остальные годы исследования значительных нарушений отмечено не было.

Часто стресс приводит к перераспределению энергетических затрат между вегетативной и генеративной сферами растений (Spiess, 1989; Усманов и др., 2001), т. е. в первом случае большая часть ресурсов тратится на защиту онтогенеза, а во втором – на поддержание репродуктивной функции растения. Результаты проведенных исследований подтверждают этот факт.

Часть исследуемых деревьев имела высокие показатели, согласно результатам, полученным на основе использованных методов (д. 3, 8, 12). Так, например, семенное потомство д. 8 в год аномальной засухи (2010 г.) характеризуется низким уровнем частоты ПМ (2.7±0.1 %). Доля клеток с микроядрами также невысока – 0.05±0.01 %. Что касается каллусогенной способности эксплантов данного дерева и реакции каллусов на условия культивирования, то для него также отмечаются высокие показатели. Первые следы каллусной ткани стали появляться уже к 4–5-м сут культивирования, показатель частоты каллусогенеза составил 91.8±3.1 %. Жизнеспособность каллусов д. 8 была высокой не только на среде без усиленной стрессовой нагрузки (22.5±3.1 сут), но и в моделируемых условиях засухи на среде с добавлением NaCl (1 %) – 22.3±2.2 сут.

Для других деревьев (д. 1, 6) были характерны низкие показатели цитогенетических параметров и каллусогенных реакций. Так, для д. 6 в 2012 г. (весенняя засуха) отмечался высокий уровень ПМ, незначительно превышающий норму в 5 %, – 5.1±2.3 %, доля клеток с микроядрами была также завышенной: 0.1±0.07 %. Формирование каллуса пришлось на 13-е сут культивирования, частота каллусогенеза – 33.3±2.8 %, жизнеспособность культур – 11.0±1.0 сут, что в два раза меньше, чем у д. 8. В условиях моделируемой засухи, на питательной среде с добавлением NaCl (1 %), рост каллусной ткани д. 6 полностью прекратился, и к 10–15-м сут культивирования наблюдалась ее 100 % некротизация.

Присутствуют деревья и с высокими показателями каллусогенных реакций, но с повышенной частотой ПМ и клеток с микроядрами. Например, в семенном потомстве

д. 9 при частоте каллусогенеза 68.9±6.9 % отмечалась высокая частота встречаемости клеток с микроядрами (2010 г.) – 0.10±0.01 %.

## Заключение

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что отбор засухоустойчивых растений необходимо вести не только по показателям, характеризующим состояние вегетативной сферы в условиях засухи, но и учитывая состояние генеративной. С этой целью предлагаем применять систему критериев, характеризующих как способность самого дерева к выживанию в засушливых условиях на основе метода культуры ткани *in vitro* (скорость формирования и жизнеспособность каллусной ткани, частота каллусогенеза), так и состояние его репродуктивной системы с помощью цитогенетического анализа семенного потомства (частота патологий митоза, доля клеток с микроядрами, митотическая активность).

## Список литературы / References

- Аминаева Е.Ю., Табацкая Т.М., Машкина О.С., Попов В.Н. Оценка засухоустойчивости отдельных генотипов *Pinus sylvestris* L. на основе метода культуры ткани *in vitro* в моделируемых стрессовых условиях. Тр. Санкт-Петербургского НИИ лесного хозяйства. 2017;1:14-22.
- [Amineva E.Yu., Tabatskaya T.M., Mashkina O.S., Popov V.N. Assessment of drought resistance in individual genotypes of *Pinus sylvestris* L. by the *in vitro* tissue culture method under simulated stress conditions. Trudy Sankt-Peterburgskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Lesnogo Khozyaystva = Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute. 2017;1:14-22. DOI 10.21178/2079-6080.2017.1.14. (in Russian)]
- Буторина А.К., Вострикова Т.В., Бельчинская Л.И., Кондратьева Л.В. Влияние промышленных сточных вод на цитогенетические показатели березы повислой. Лесн. хоз-во. 2005;6:27-28.
- [Butorina A.K., Vostrikova T.V., Bel'chinskaya L.I., Kondrat'eva L.V. The influence of industrial wastewater on the cytogenetic parameters of white birch. Lesnoe Khozyaystvo = Forestry. 2005;6:27-28. (in Russian)]
- Буторина А.К., Калаев В.Н., Карпова С.С. Цитогенетические нарушения в соматических клетках человека и березы повислой в районах г. Воронежа с различной интенсивностью антропогенного загрязнения. Экология. 2002;6:438-441.
- [Butorina A.K., Kalaev V.N., Karpova S.S. Cytogenetic damage of human somatic cells and weeping birch cells in Voronezh districts with different levels of anthropogenic pollution. Russian Journal of Ecology. 2002;6:413-416.]
- Буторина А.К., Калаев В.Н., Миронов А.Н., Смородинова В.А., Мазурова И.Э., Дорошев С.А., Сенькевич Е.В. Цитогенетическая изменчивость в популяциях сосны обыкновенной. Экология. 2001;3:216-220.
- [Butorina A.K., Kalaev V.N., Mironov A.N., Smorodinova V.A., Mazurova I.E., Doroshev S.A., Sen'kevich E.V. Cytogenetic variation in populations of scots pine. Russian Journal of Ecology. 2001; 3:198-202.]
- Генкель П.А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. М., 1982.
- [Genkel' P.A. Physiology of Heat and Drought Tolerance in Plants. Moscow, 1982. (in Russian)]
- Егорова Н.А. Разработка методических основ клеточной селекции лаванды *in vitro* на устойчивость к NaCl. Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2011;5:173-179.
- [Egorova N.A. Methodological bases of the development of lavender cell selection *in vitro* for resistance to NaCl. Ekosistemy, ikh Optimizatsiya i Okhrana = Optimization and Protection of Ecosystems. 2011;5:173-179. (in Russian)]

- Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011.  
[Ignatova S.A. Cell Technologies in Plant Industry, Genetics, and Breeding of Cultivated Plants: Tasks, Opportunities, and Development of *in vitro* Systems. Odessa: Astroprint Publ., 2011. (in Russian)]
- Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Некрасов В.Н. Использование микроядерного теста в скрининге и мониторинге мутагенов. Цитология и генетика. 1988;22(1):67-72.  
[Il'inskikh N.N., Il'inskikh I.N., Nekrasov V.N. Use of the micronuclear test in the screening and monitoring of mutagens. Tsytologiya i Genetika = Cytology and Genetics. 1988;22(1):67-72. (in Russian)]
- Кузнецова Н.Ф. Чувствительность генеративной сферы сосны обыкновенной к засухе в Воронежской области. Лесоведение. 2010;6:58-65.  
[Kuznetsova N.F. The drought sensitivity of the Scots pine reproductive system in the Voronezh region. Lesovedenie = Forest Sciences. 2010;6:58-65. (in Russian)]
- Кузнецова Н.Ф. Особенности семеношения сосны обыкновенной на территории ЦПР в засуху 2010 г. Хвойные бореальной зоны. 2012;30(3-4):270-276.  
[Kuznetsova N.F. Features of Scotch pine seeding in the Central Black Earth region in the 2010 drought. Khvoynye Borealnoy Zony = Conifers of the Boreal Area. 2012;30(3-4):270-276. (in Russian)]
- Кузнецова Н.Ф. Развитие неспецифической и специфической реакций у *Pinus sylvestris* L. на популяционном уровне в стрессовом градиенте засушливых лет. Экология. 2015;5:332-338.  
[Kuznetsova N.F. Development of specific and nonspecific responses to stress in *Pinus sylvestris* L. at population level in a gradient of drought years. Russian Journal of Ecology. 2015;5:405-410.]
- Кузнецова Н.Ф., Машкина О.С. Патент на селекционное достижение «Сосна Острогжская». № 9187 от 21.07.2017. Заявка № 8355164 от 26.10.2016. Воронежская область, с. Солдатское, Острогжское лесничество.  
[Kuznetsova N.F., Mashkina O.S. Ostrogzhskaya Pine. Patent RF for Breeding Invention No. 9187 of 21.07.2017. (in Russian)]
- Кунах В.А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений. Молекулярная и прикладная генетика. 2011;12:7-14.  
[Kunakh V.A. Plasticity of the somatic cell genome and plant adaptability. Molekulyarnaya i Prikladnaya Genetika = Molecular and Applied Genetics. 2011;12:7-14. (in Russian)]
- Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. СПб., 2010.  
[Lutova L.A. Biotechnology of Higher Plants. St. Petersburg, 2010. (in Russian)]
- Миркин Б.М., Наумова Л.Г., Соломец А.И. Современная наука о растительности. М., 2000.  
[Mirkin B.M., Naumova L.G., Solomets A.I. Modern Plant Science. Moscow, 2000. (in Russian)]
- Митрофанов Ю.А. Радиочувствительность клеток на различных фазах митотического цикла. Успехи современной генетики. М.: Наука, 1969;125-160.  
[Mitrofanov Yu.A. Radiosensitivity of cells at various phases of the mitotic cycle. Advances in Current Genetics. Moscow: Nauka Publ., 1969;125-160. (in Russian)]
- Пардаева Е.Ю., Машкина О.С., Кузнецова Н.Ф. Состояние генеративной сферы сосны обыкновенной как биоиндикатора устойчивости лесов на территории Центрально-Черноземного района в связи с глобальным изменением климата. Тр. Санкт-Петербургского НИИ лесного хозяйства. 2013;2:16-17.  
[Pardaeva E.Yu., Mashkina O.S., Kuznetsova N.F. The state of Scots pine reproductive system as a bioindicator of forest stability in the Central Black Earth region in connection with the global climate change. Trudy Sankt-Peterburgskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Lesnogo Khozyaystva = Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute. 2013;2:16-17. (in Russian)]
- Пахомова В.М. Основы фитострессологии. Казань: Изд-во КГСХА, 1999.  
[Pakhomova V.M. Basics of Plant Stressology. Kazan, 1999. (in Russian)]
- Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция. М.: Наука, 1964.  
[Pravdin L.F. Scots Pine. Variability, Intraspecific Taxonomy, and Breeding. Moscow: Nauka Publ., 1964. (in Russian)]
- Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы и ячменя на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды. Докл. РАСХН. 2010;3:14-16.  
[Rosseyev V.M., Belan I.A., Rosseyeva L.P. *In vitro* test of spring soft wheat and barley for resistance to adverse abiotic environmental factors. Doklady Rossiyskoy Akademii Selskokhozyaystvennykh Nauk = Proceedings of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2010;3:14-16. (in Russian)]
- Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Использование метода *in vitro* в селекции пшеницы мягкой яровой. Вестн. Алтайск. гос. аграр. ун-та. 2016;2(136):5-9.  
[Rosseyev V.M., Belan I.A., Rosseyeva L.P. The *in vitro* method in spring soft wheat breeding. Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University. 2016;2(136):5-9. (in Russian)]
- Соболева Г.В. Влияние осмотического стресса на процессы роста и морфогенеза в длительно пассируемых каллусных культурах гороха (*Pisum sativum* L.). Зернобобовые и крупяные культуры. 2013;1(5):8-15.  
[Soboleva G.V. Effect of osmotic stress on growth and morphogenesis processes in long-propagated pea (*Pisum sativum* L.) callus cultures. Zernobobovye i Krupyanye Kul'tury = Legumes and Groat Crops. 2013;1(5):8-15. (in Russian)]
- Терлецкая Н.В., Жумабаева Б.А., Хайленко Н.А. Действие солевого стресса на соматические клетки в суспензионной культуре пшеницы и ячменя. Вестн. КазНУ, Сер. Биологическая. 2008;36(1):63-66.  
[Terletckaya N.V., Zhumabaeva B.A., Hajlenko N.A. Effect of salinity stress on somatic cells in a wheat and barley suspension culture. Vestnik Kazanskogo Natsionalnogo Universiteta, Ser. Biologicheskaya = Bulletin of the Kazan National University (Ser. Biol.). 2008;36(1):63-66. (in Russian)]
- Тимофеев-Ресовский Н.В., Яблоков А.В., Глотов Н.В. Очерк учения о популяции. М., 1973.  
[Timofeev-Resovskiy N.V., Yablokov A.V., Glotov N.V. An Essay on Population. Moscow, 1973. (in Russian)]
- Топильская Л.А., Лучникова С.А., Чувашина Н.П. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины на ацетогематоксилиновых давленных препаратах. Бюл. ЦГЛ им. И.В. Мичурина. 1975;22:107.  
[Topil'skaya L.A., Luchnikova S.A., Chuvashina N.P. Study of somatic and meiotic currant chromosomes in acetoheмоxylin squash slides. Byulleten Nauchnoy Informatsii Tsentral'noy Geneticheskoy Laboratorii imeni I.V. Michurina = Scientific Information Bulletin, Michurin Central Genetic Laboratory. 1975;22:107. (in Russian)]
- Усманов И.Ю., Рахмакулова З.Ф., Кулагин А.Ю. Экологическая физиология растений. М.: Логос, 2001.  
[Usmanov I.Yu., Rakhmakulova Z.F., Kulagin A.Yu. Ecological Plant Physiology. Moscow: Logos Publ., 2001. (in Russian)]
- Чернодубов А.И., Смогунова О.А. Сосна обыкновенная в различных экологических условиях юга России. Экология Центрального Черноземья Российской Федерации. Липецк, 1998;65-68.  
[Chernodubov A.I., Smogunova O.A. Scots Pine in Various Ecological Conditions of southern Russia. Ecology of the Central Black



- Earth Region, Russian Federation. Lipetsk, 1998;65-68. (in Russian)]
- Шакина Н.П., Иванова А.Р., Бирман Б.А., Скриптунова Е.Н. Блокирование: условия лета 2010 года в контексте современных знаний. Анализ условий аномальной погоды на территории России летом 2010 года. М.; Триада лтд, 2011;6-21.  
[Shakina N.P., Ivanova A.R., Birman B.A., Skriptunova E.N. Blocking: the conditions of the summer of 2010 in the context of modern knowledge. Analysis of abnormal weather conditions in Russia in the summer of 2010. Moscow: Triada ltd, 2011;6-21. (in Russian)]
- Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Мирошников А.И. Лесная биотехнология: методы, технологии, перспективы. Биотехнология. 2008;5:3-22.  
[Shestibratov K.A., Lebedev V.G., Miroshnikov A.I. Forest biotechnology: methods, technologies, and prospects. Biotekhnologiya = Biotechnology. 2008;5:3-22. (in Russian)]
- Яковец О.Г. Фитофизиология стресса. Курс лекций. Минск, 2009.  
[Yakovets O.G. Plant physiology of Stress. Lecture Course. Minsk, 2009. (in Russian)]
- Murashige T.A., Skoog T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473-497.
- Tardieu F. Plant tolerance to water deficit physical limits and possibilities for progress. *Comp. R. GeoSci.* 2005;337:57-67.
- Tugce K., Yasemin E. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *G.U. J. Science.* 2005;5(4):723-740.
- Voronova A., Jansons A., Ruņģis D. Expression of retrotransposon-like sequences in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in response to heat stress. *Environ. Exp. Biol.* 2011;9:121-127.
- Vuosku J., Läära E., Sääskilähti M., Muilu R., Sutela S., Altabella T., Sarjala T., Häggman H. Consistency of polyamine profiles and expression of arginine decarboxylase in mitosis during zygotic embryogenesis of Scots pine. *Plant Physiol.* 2006;142:1027-1038.
- Yang H., Shi G., Wang H., Xu Q. Involvement of polyamines in adaptation of *Potamogeton crispus* L. to cadmium stress. *Aquat. Toxicol.* 2010;100:282-288.

---

#### ORCID ID

E.Yu. Amineva [orcid.org/0000-0001-6800-7944](https://orcid.org/0000-0001-6800-7944)  
A.P. Gureev [orcid.org/0000-0003-3562-5329](https://orcid.org/0000-0003-3562-5329)  
O.S. Mashkina [orcid.org/0000-0001-8252-2192](https://orcid.org/0000-0001-8252-2192)  
V.N. Popov [orcid.org/0000-0003-1294-8686](https://orcid.org/0000-0003-1294-8686)

**Благодарности.** Выполнение исследований частично поддержано грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ (соглашение 14.Z57.18.3451-НШ).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 12.07.2018. После доработки 07.08.2018. Принята к публикации 25.09.2018.